

Obilježavanje i detekcija proteina Pir3 u različitim mutantima egzosoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Perišić, Korina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:904967>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Korina Perišić
0058217087

**Obilježavanje i detekcija proteina Pir3 u različitim
mutantima egzosoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 2

Mentor: izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Obilježavanje i detekcija proteina Pir3 u različitim mutantima egzosoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Korina Perišić, 0058217087

Sažetak:

U eukariotskim stanicama, procesiranje i razgradnja RNA molekula postignuta je aktivnošću multiproteinskog kompleksa RNA egzosoma koji je jedan od važnih regulatora stanične stijenke kvasca. Promjene u staničnoj stijenci događaju se ovisno o fazi staničnog ciklusa, dostupnosti hranjivih tvari i uvjetima okoline kao što su pH, temperatura i dostupnost kisika, a usko su povezane s promjenama u proteinskom sastavu koji se također mijenja kroz različite faze rasta stanice. Jezgra RNA egzosoma sastoji se od devet strukturnih podjedinica na koje su vezane dvije katalitičke podjedinice koje imaju 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost, Dis3 i Rrp6. Za aktivnost RNA egzosoma važnu ulogu ima i prisutnost kofaktora Rrp47, Mpp6 i TRAMP kompleksa. Problemi u funkcioniranju RNA egzosoma utječu na stabilnost stanične stijenke prilikom čega je pogođen i proteinski sastav stijenke. Cilj ovog rada bio je ispitati kako nedostatak pojedinog kofaktora RNA egzosoma utječe na ekspresiju proteina stanične stijenke kvasca, Pir3. U tu svrhu protein Pir3 je obilježen hemaglutininskom oznakom u različitim mutantima kojima nedostaje pojedini kofaktor RNA egzosoma, te je praćena njegova ekspresija tijekom logaritamske i stacionarne faze rasta stanica. Rezultati ovog rada pokazuju kako kofaktori RNA egzosoma imaju utjecaj na ekspresiju proteina stanične stijenke kvasca.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, stanična stijenka, RNA egzosom, Pir3 protein

Rad sadrži: 28 stranica, 11 slika, 7 tablica, 46 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Nada Šupljika, mag. oecol. et prot. nat.

Datum obrane: 18.7.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Labeling and detection of Pir3 protein in various mutants of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast
exosome**

Korina Perišić, 0058217087

Abstract:

In eukaryotic cells, processing and degradation of RNA molecules occurs through the activity of the multiprotein RNA exosome complex, which is one of the major regulators of the yeast cell wall. Changes in the cell wall occur depending on the phase of the cell cycle, the availability of nutrients and environmental conditions such as pH, temperature and oxygen availability, and are closely related to changes in protein composition, which also changes during different phases of cell growth. The core of the RNA exosome consists of nine structural subunits to which two catalytic subunits with 3'-5' exoribonuclease activity, Dis3 and Rrp6, are attached. The presence of the cofactors Rrp47, Mpp6 and the TRAMP complex plays an important role in RNA exosome activity. Problems in the function of RNA exosomes affect the stability of the cell wall, which also affects the protein composition of the wall. The aim of this work was to investigate how the absence of a specific exosome RNA cofactor affects the expression of the yeast cell wall protein, Pir3. To this end, the Pir3 protein was tagged with a hemagglutinin tag in different mutants lacking a specific exosome RNA cofactor and its expression was monitored during the logarithmic and stationary phases of cell growth. The results of this work demonstrate how exosome RNA cofactors affect the expression of yeast cell wall proteins.

Keywords: yeast *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, RNA exosome, Pir3 protein

Thesis contains: 28 pages, 11 figures, 7 tables, 46 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Full Professor, PhD Igor Stuparević

Technical support and assistance: Nada Šupljika, mag. oecol. et prot. nat.

Thesis defended: 18.7.2022.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2.1. Proteini stanične stijenke	3
2.2.2. Pir proteini.....	4
2.3. RNA egzosom.....	5
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Kemikalije i enzimi	8
3.1.2. Otopine i puferi	9
3.1.3. Sojevi kvasca.....	9
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj stanica kvasaca.....	10
3.1.5. Početnice	11
3.1.6. Plazmid pYM16.....	12
3.2. Metode	12
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	12
3.2.2. Gel elektroforeza DNA.....	14
3.2.3. Određivanje koncentracije DNA.....	14
3.2.4. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LiAc metodom	14
3.2.5. Izolacija proteina	15
3.2.6. Gel elektroforeza proteina	15
3.2.7. Western blot.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Označavanje gena <i>PIR3</i> hemaglutininskom sekvencom u različitim mutantima RNA egzosoma	17
4.2. PCR analiza gena <i>PIR3</i> u konstruiranim sojevima.....	18
4.3. Western blot analiza proteina Pir3 u proteinskim ekstraktima konstruiranih sojeva	19
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. POPIS LITERATURE.....	25

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariot koji se koristi kao modelni organizam u biokemijskim, genetičkim i molekularno-biološkim studijama zbog pogodnih karakteristika kao što su jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme, sekvenciran genom i sličnost s fiziološkim događajima u ljudskim stanicama (složena unutarstanična organizacija, membranski i mitohondrijski transport, signalni sustav stanice, metabolizam lipida) (Karathia i sur., 2011; Liu i sur., 2017).

Stanična stijenka kvasca kompleksna je struktura koja okružuje stanicu i daje joj oblik, čvrstoću i zaštitu (Harold, 2002). Sudjeluje u fiziološkim procesima kao što su pupanje, parenje, flokulacija, sporulacija i odgovor na vanjski stres. Građena je od unutarnjeg sloja polisaharida (β -1,3- i β -1,6-glukana) i hitina te vanjskog sloja manoproteina (Fleet, 1991). Manoproteini se za staničnu stijenku vežu kovalentno ili nekovalentno. Pir proteini (Proteins with Internal Repeats) svrstani su u grupu kovalentno vezanih proteina stanične stijenke. Obitelj Pir proteina sastoji se od pet proteina koji dijele zajedničke karakteristike kao što su ponavljajuće sekvence aminokiselinskih ostataka na N-terminalnom kraju, visoka O-glikoziliranost, procesiranje Kex2 proteazom te ne sadrže GPI sidro (Klis i sur., 2002).

RNA egzosom je 3'-5' egzoribonukleazni multiproteinski kompleks koji je uključen u procesiranje, razgradnju i kontrolu kvalitete RNA molekula (Chlebowski i sur., 2013). Sastoji se od devet podjedinica koje tvore katalitički inaktivnu jezgru Exo9 i dvije katalitički aktivne podjedinice Dis3 (posjeduje 3'-5' egzoribonukleaznu i endoribonukleaznu aktivnost) i Rrp6 (posjeduje 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost). Delecija gena koji kodiraju za katalitičku podjedinicu Dis3 je letalna, dok je delecija gena koji kodira za katalitičku podjedinicu Rrp6 vijabilna, ali dovodi do sporijeg rasta i temperaturne osjetljivosti (Mitchell i sur., 1997). Kako bi stanična stijenka obavljala svoju ulogu, stanica je konstantno pregrađuje i mijenja, te sastav i struktura stijenke ovise o fazi staničnog ciklusa, dostupnosti hranjivih tvari i okolini u kojoj se stanica nalazi (Herskowitz, 1988).

U tu svrhu, cilj ovog rada bio je obilježavanje proteina Pir3 hemaglutininskom oznakom na C-terminalnom kraju u različitim mutantima podjedinica egzosoma kako bi se isti mogli pratiti tijekom logaritamske i stacionarne faza rasta stanica. Ovakvim pristupom dobili smo uvid o utjecaju kofaktora RNA egzosoma na ekspresiju proteina stanične stijenke, specifično proteina Pir3.

2. TEORIJSKI DIO

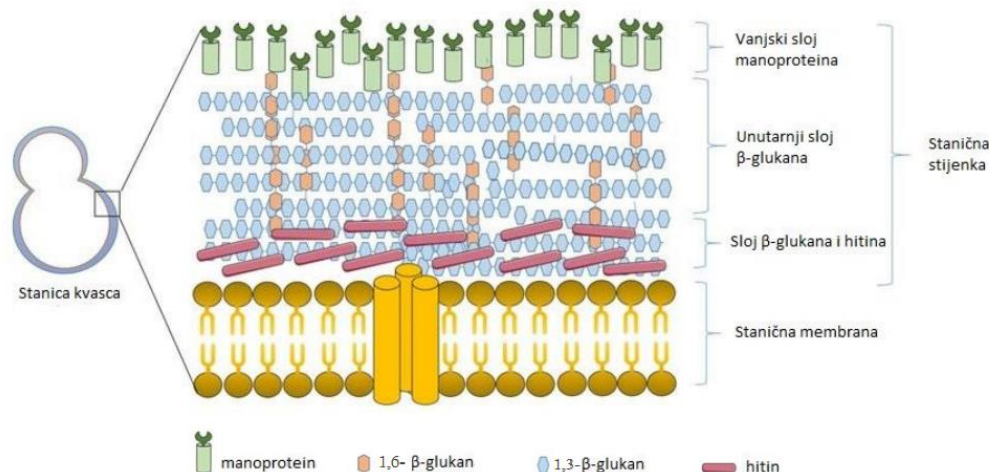
2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji pripada carstvu gljiva. Kvasac ima ovalni oblik, promjera 4-6 μm ovisno o ploeditetu (haploidne ili diploidne stanice). Haploidna stanica kvasca sadrži 16 kromosoma veličine od 200-2000 kb. Ukupna sekvenca kromosomalne DNA veličine 12052 kb objavljena je 1996. godine čime je *S. cerevisiae* postao prvi eukariot s potpuno sekvenciranim genomom. Pronađeno je ukupno 6183 otvorenih okvira čitanja (ORF) od kojih oko 5800 odgovara genima koji kodiraju za proteine (Goffeau i sur., 1996; Sherman, 2002). Tip parenja stanica kvasca određen je informacijom u lokusu *MAT* na III. kromosomu. Haploidni sojevi javljaju se u dva tipa parenja **a** ili **α** . Oba tipa parenja se u povoljnim uvjetima mogu razmnožavati mitozom kao stabilne haploidne stanice pri čemu nove stanice kćeri nastaju kao pupovi koji rastu i odvajaju se od stanice majke ili se mogu uključiti u spolno razmnožavanje u kojem stanice suprotnog tipa parenja komuniciraju pomoću feromona. Kvasac **a** tipa parenja oslobađa feromon **a**, dok na površini posjeduje receptore za feromon **α** . Kvasac **α** tipa parenja oslobađa feromon **α** , a na površini posjeduje receptore za feromon **a**. Feromoni se vežu na receptore koji se nalaze na površini stanice suprotnog tipa parenja, dolazi do fuzije i nastanka diploidne stanice **a/ α** tipa parenja. Diploidni sojevi se u povoljnim uvjetima također razmnožavaju mitozom, a u nepovoljnim uvjetima dolazi do mejoze i sporulacije. Tijekom mejoze diploidna jezgra se podijeli na četiri haploidne jezgre koje se inkapsuliraju u četiri haploidne askospore, dvije **a** i dvije **α** tipa parenja. U povoljnim uvjetima haploidne askospore germiniraju u vegetativne stanice koje mogu ući u fazu mitoze ili mejoze (Casci, 2009).

2.2. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka je ekstracelularna organela koja čini 15-30 % suhe mase vegetativne stanice kvasca *S. cerevisiae* (Yin i sur., 2007). Neophodna je za komunikaciju stanice s okolinom. Osigurava oblik i čvrstoću stanice te zaštitu citoplazmatske membrane i staničnih organela koji se nalaze unutar citosola (Harold, 2002). U stanicama kvasca veća je koncentracija otopljenih tvari nego izvan stanice. Voda i otopljene tvari izvan stanice ulaze u stanicu kako bi se izjednačio koncentracijski gradijent, a nastali pritisak ravnomjerno se raspoređuje površinom stanične stijenke čime se sprječava puknuće stanice (Ecker i sur., 2006). Sinergijom čvrstoće i elastičnosti stanične stijenke stanice kvasca mogu podnijeti unutarstanične tlakove koji iznose preko 10 bara i pritom zadržati svoj oblik (Klis i sur., 2006).

Stanična stijenka građena je od polisaharidnih polimera glukana i hitina te manoproteina (Slika 1.) (Fleet, 1991). Elektronskom mikrografijom uočena je dvoslojna struktura unutar koje se razlikuju unutarnji i vanjski sloj (Osumi, 1998). Mehanička čvrstoća stijenke uglavnom je posljedica unutarnjeg sloja koji se sastoji od glukana (β -1,3-glukana i β -1,6-glukana) umreženih s hitinom. Unutarnji glukanski sloj ima dva dijela: vlaknasti i amorfni sloj. Vlaknasti sloj izgrađen je od β -1,3-glukana koji je nereducirajućim krajem vezan na reducirajući kraj hitina. (Kollar i sur., 1995). β -1,3-glukan polimer građen je od oko 1500 jedinica glukoze povezanih β -1,3-glikozidnom vezom, a 50-ak glukoznih jedinica grana se β -1,6-glikozidnim vezama. Lanac hitina izgrađen je od 110 β -1,4-N-acetilglukozamina te je najmanje zastupljeni polisaharid unutar stanične stijenke. Formiranjem vodikovih veza linearni lanci hitina produžuju se u mikrofibrile što pridonosi otpornosti prilikom istezanja stijenke. Hitin gradi primarni septum pa se uglavnom nalazi u ožiljcima zaostalim nakon pupanja (Shaw, 1991). S vanjske strane nalazi se amorfni sloj polimera β -1,6-glukana koji povezuje dijelove stanične stijenke. Kovalentnim vezanjem na β -1,3-glukan, hitin i manoproteine, β -1,6-glukan doprinosi stabilnosti i obliku stijenke. Vanjski sloj stanične stijenke, građen je od O- i N-glikoziliranih manoproteina s visokim sadržajem manoze te štiti stanicu od izvanstaničnih enzima (Klis i sur., 2002).



Slika 1. Shematski prikaz građe stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anwar i sur., 2017).

2.2.1. Proteini stanične stijenke

Do danas je identificirano preko 30 proteina stanične stijenke (Mrša i sur., 1997). Za većinu ovih proteina ne zna se uloga, ali pretpostavlja se da imaju funkciju u izgradnji, reorganizaciji

i održavanju glukanske mreže tijekom rasta, razmnožavanja i sporulacije (Zlotnik i sur., 1984; Teparić i sur., 2010).

Prema načinu vezanja za staničnu stijenkku proteine dijelimo u tri grupe. Prvu grupu čine proteini koji se za komponente stanične stijenke vežu disulfidnim vezama ili nekovalentno. Nazivaju se Scw (Soluble Cell Wall Protein) proteini i čine približno 80 % svih manoproteina, te su većinom O-glikozilirani (Cappellaro i sur., 1998). Mogu se izolirati djelovanjem ditiotreitola ili zagrijavanjem otopine SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola (Mrša i sur., 1997). Drugu grupu čine proteini koji se za komponente stanične stijenke, preko β -1,6-glukana, kovalentno vežu na β -1,3-glukan. Nazivaju se GPI proteini jer se preko C- terminalnog kraja koji sadrži glikozil-fosfatidilinozitolno sidro vežu na glukansku mrežu. Mogu se izolirati različitim glukanzama npr. β -1,3-glukanazom (Mrša i sur., 1999.). Treću grupu čine Pir proteini koji se esterskom vezom direktno vežu na β -1,3-glukan (Ecker i sur., 2006). Mogu se izolirati djelovanjem blage lužine (Mrša i sur., 1999).

2.2.2. Pir proteini

Pir proteini svrstani su u skupinu kovalentno vezanih proteina stanične stijenke (Klis i sur., 2002). Karakteriziraju ih ponavljajuće sekvence duljine 18-19 aminokiselinskih ostataka na N-terminalnom kraju od kojih je 8 (S, Q, D, G, Q, Q, A i T) visoko konzervirano. Sekvence se ponavljaju 1-10 puta ovisno o proteinu. Obitelj Pir proteina dijeli zajedničke karakteristike kao što su homologija, signalni peptid procesiran Kex2 proteazom u Golgijevom tijelu, ne sadrže GPI sidro, bogati su serinom i treoninom, sadrže hidroksilne aminokiselinske ostatke koji su O-glikozilirani (Castillo i sur., 2003). Obitelj Pir proteina sastoji se od pet proteina: Pir1p/Ccw6p, Pir2p/Hsp150p/Ccw7p/Ore1p, Pir3p/Ccw8p, Pir4p/Ccw5p/ Ccw11p/Cis3p/Scw8 i Pir5 (tablica 1.). Pir proteini se za staničnu stijenkku vežu na β -1,3-glukan esterskom vezom između karboksilne skupine glutaminske kiseline i hidroksilne skupine glukoze. Ova alkalno labilna veza razlog je korištenja blage alkalne otopine (30 mM NaOH) u svrhu ekstrakcije Pir proteina (Mrša i sur., 1999). Pretpostavlja se da druga regija bitna za vezanje Pir proteina na staničnu stijenkku uključuje cisteinske ostatke na C-terminalnom kraju. Uloga Pir proteina u staničnoj stijenkki nije u potpunosti razjašnjena, međutim delecija gena koji kodiraju za proteine Ccw5, Ccw7, Ccw6 i Ccw8 dovodi do promijenjenih morfoloških karakteristika, produljenog vremena rasta stanica te povećane osjetljivosti na inhibitore koji djeluju na sintezu stanične stijenke (Mrša i Tanner, 1999).

Tablica 1. Podjela Pir proteina, njihove molekulske mase, broj aminokiselinskih ostataka i broj ponavljajućih sekvenci (yeastgenome.org, Ecker i sur., 2006).

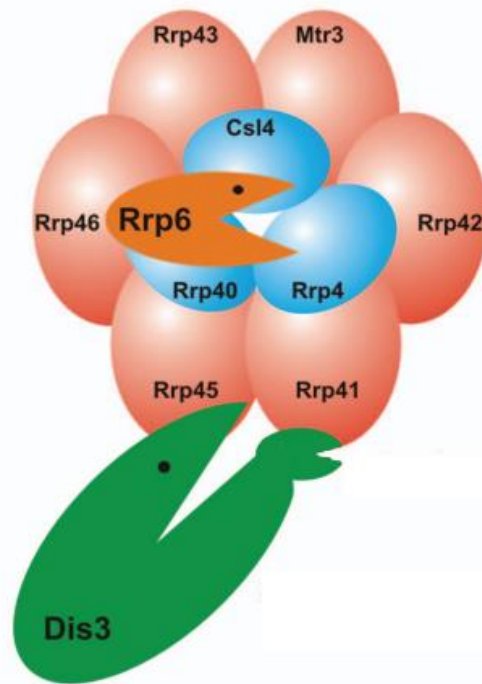
Pir protein	Molekulska masa (Da)	Broj aminokiselinskih ostataka	Broj ponavljajućih sekvenci
Pir1	34621.0	341	8
Pir2	41054.6	413	10
Pir3	33001.8	325	8
Pir4	23233.8	227	1
Pir5	30221.7	287	4

Pir1 pričvršćen je na staničnu stijenu preko β -1,3-glukana te je O-glikozilirani. Pir2 je O-manozilirani protein koji se kovalentno veže za staničnu stijenu preko β -1,3-glukana i disulfidnih mostova. Njegova ekspresija povećava u nepovoljnim uvjetima kao što je temperaturni šok. Protein Pir3 također je O-glikozilirani te sudjeluje u stabilizaciji stanične stijene. Njegova ekspresija ovisi o fazi staničnog ciklusa, a svoj maksimum dostiže u G1 fazi mitoze (Mrša i sur., 1999; Toh-e i sur., 1993; Enyenihi i Sauders, 2003). Pir4 je manozilirani glikoprotein stanične stijene koji sadrži jednu ponavljajuću regiju preko kojih se veže na staničnu stijenu kvasca (Moukadiri i sur., 1999). Pir5 je član Pir obitelji proteina stanične stijene, prisutan i u endoplazmatskom retikulumu i vakuoli. *PIR5* je neesencijalan gen potreban za sporulaciju (Enyenihi i Sauders, 2003).

2.3. RNA egzozom

Stanice kvasca sadrže razne vrste RNA molekula, od kojih gotovo sve zahtijevaju obradu kako bi postale potpuno zrele i funkcionalne (Houseley, 2012). RNA egzozom (slika 2.) je multiproteinski kompleks koji doprinosi mnogim koracima sazrijevanja 3' krajeva rRNA (ribosomalna RNA), tRNA (transportna RNA), snRNA (male nuklearne RNA) i snoRNA (nukleolarne RNA). Nadalje, RNA egzozom razgrađuje nusproizvode reakcija obrade RNA i aberantne RNA koje proizlaze iz pogrešaka u sazrijevanju RNA. Kako RNA egzozom prepoznaje aberantne RNA molekule nije u potpunosti razjašnjeno (Thoms i sur., 2015). RNA egzozom se može pronaći i u jezgri i u citoplazmi gdje sudjeluje u procesiranju i degradaciji mRNA molekula. Egzozom ima dvoslojnu jezgru koja se sastoji od 9 katalitički inaktivnih podjedinica – Exo9. Gornji sloj Exo9 sastoji se od „kape“ građene od 3 podjedinice (Csl4, Rrp4

i Rrp40) koje pripadaju proteinskoj skupini RNaza S1/KH. „Kapa“ se nalazi na prstenu od šest podjedinica (Rrp41, Rrp45, Rrp46, Rrp43, Mtr3 i Rrp42) koje pripadaju proteinskoj skupini RNaza PH (Mitchell i sur., 1997). Uz katalitički inaktivnu jezgru egzosoma, postoje i dvije katalitičke podjedinice koje se nalaze na suprotnim stranama egzosoma (Liu i sur., 2006). Katalitička podjedinica Rrp44 (također poznata kao Dis3) ima 3'-5' egzoribonukleaznu i endoribonukleaznu aktivnost, a stupa u interakcije s Exo9 tvoreći kompleks Exo10. U kvascu, Exo10 je prisutan u cijeloj stanici, dok nuklearno ograničen kompleks Exo12 dodatno sadrži katalitičku podjedinicu Rrp6 i njen kofaktor Rrp47 koji ima važnu ulogu u stabilizaciji proteina Rrp6 te se međusobnom interakcijom štite od degradacije (Stuparević i sur., 2013). Katalitička podjedinica Rrp6 ima 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost. Delecija gena koji kodiraju za katalitičku podjedinicu Dis3 je letalna, a delecija gena koji kodira za katalitičku podjedinicu Rrp6 nije letalna, ali dovodi do temperaturene osjetljivosti i sporijeg rasta stanice (Mitchell i sur., 1997). Aktivnost nuklearnog RNA egzosoma stimulirana je kofaktorima Mpp6 i TRAMP kompleksom koji usmjeravaju specijalizirane supstrate i pomažu RNA degradaciji (Stuparević i sur., 2013). TRAMP kompleks sastavljen je od 3 podjedinice koje osiguravaju vezanje RNA (Air1 ili Air2 podjedinica), RNA-helikaznu (Mtr4 podjedinica) i poli(A)-polimeraznu (Trf4 ili Trf5 podjedinica) aktivnost (Wyers i sur., 2005).



Slika 2. Struktura RNA egzozoma; jezgra egzozoma Exo9 sastoji se od 9 katalitički inaktivnih podjedinica obojanih ružičastom i plavom bojom, 2 katalitički aktivne podjedinice Dis3 obojana zelenom bojom i Rrp6 obojana narančastom bojom daju ribonukleaznu aktivnost RNA egzozomu (Søren i sur., 2011).

Kompleks egzozoma je važan, evolucijski očuvan čimbenik u procesiranju i kontroli RNA. Kompleksi egzozoma iz eukariota i Archaea imaju vrlo slične strukture jezgre. Središnji kanal je dovoljno širok (8-10 Å) da primi jednolančanu RNA, ali ne i dvolančanu RNA što je glavna karakteristika egzozoma koja povezuje niže i više eukariote. To sugerira, da se RNA supstrati odmotaju i zatim provlače kroz kompleks prema unutarnjem katalitičkom mjestu (Liu i sur., 2006). Ovaj model potvrđen je za arhealnu strukturu jezgre egzozoma, u kojoj su fosforolitička aktivna mjesta smještena na unutarnjim stranama svakog od tri identična heterodimera koji tvore jezgru, a RNA se provlači kroz središte strukture kako bi došla do aktivnog mjesta. Kanal eukariotskog egzozoma sastoji se od šest proteina s homologijom prema fosforolitičkim nukleazama, formiranih u dimere koji nalikuju arhealnim parovima (Dziembowski i sur., 2007).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

- Agar: Liofilchem (SAD)
- Aminokiseline, SDS, akrilamid, agaroza, etidijev bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, β -merkaptoetanol, litij acetat dihidrat – Sigma Aldrich, Merck (Njemačka)
- Kvaščev ekstrakt: Biolife (Italija)
- Clarity Western ECL Substrate Luminol/enhancer solution, Clarity Western ECL Substrate Peroxide solution – Biorad (SAD)
- Pepton – Becton Dickinson and Company (BD) (SAD)
- Taq polimeraza, OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer – New England Biolabs (SAD)
- Primeri (forward, reverse) korišteni za PCR i PCR kolonija – Macrogen Europe (Nizozemska)
- Pufer za lančanu reakciju polimerazom (PCR), deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu – Fermentas, Thermo Fischer Scientific (SAD)
- LMW standardi za Western blot – GE Healthcare (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Švedska)
- Amonijev persulfat – Fluka (Švedska)
- N, N, N', N' – tetrametil-etilendiamin (TEMED), Ponceau S (PEG 4000) – Serva (Njemačka)
- Izopropanol – Lachner (Češka)
- Anti-HA – peroksidaza antitijela, higromicin B - Roche Diagnostics GmbH (Njemačka)
- Glukoza – Gram Mol (Hrvatska)
- Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics (Kina) i Thermo Fisher Scientific (SAD), dok su kiseline, baze i alkoholi nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Francuska).

3.1.2. Otopine i puferi

- Litijev acetat (1 mol/L): pripravlja se otapanjem 2,044 g litijevog acetata dihidrata u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 20 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i sprema na 4 °C.
- 50 x koncentrirani pufer TAE (2 mol/L Tris; 1 mol/L octene kiseline; 50 mmol/L EDTA): priprema se otapanjem 242 g Tris-a u 600 mL deionizirane vode, dodaje se 57,1 mL ledene octene kiseline i 100 mL 0,5 mol/L EDTA (pH 8). Deionizirana voda se dodaje do konačnog volumena od 1 L.
- Otopina etidijevog bromida (0,5 mg/mL): otopina etidijevog bromida (5 g/L) razrijedi se u omjeru 1:10000. Otopina se čuva u tamnoj boci pri 4 °C.
- Laemmli pufer (5x koncentriran): priprema se otapanjem 1,5 g Trisa i 0,19 g EDTA III u 10 mL deionizirane vode te podešavanjem na pH 6,8, zatim se dodaje 5 g SDS-a, 12,5 mL β-merkaptoetanol, 20 mL glicerola i 0,005 % bromofenol plavo. Volumen otopine se podesi na 50 mL dodatkom deionizirane vode.
- 10x koncentrirani pufer za proteinsku elektroforezu: pripravlja se otapanjem 30,3 g Trisa, 144 g glicina i 10 g SDS u 1 L deionizirane vode.
- Gel za proteinsku elektroforezu: 10% donji gel (Tris-HCl pufer 1,25 mL, akrilamid (30 g/L akrilamida, 8 g/L bisakrilamida) 1,25 mL, H₂O 1,25 mL, TEMED 2,5 μL, APS (10% amonij persulfat u vodi) 19 μL); 4,5% gornji gel: (Tris-HCl pufer 1,065 mL, akrilamid (30 g/L akrilamida, 8 g/L bisakrilamida) 0,15 mL, TEMED 2,5 μL, APS (10% amonij persulfat u vodi) 19 μL) 11,25 μL).
- Pufer za blokiranje membrane: priprema se otapanjem 0,1 g obranog mlijeka u prahu u 10 mL TBST pufera (količina dovoljna za jedan gel).
- Towbin pufer: pripravlja se miješanjem 3,03 g Trisa, 14,4 g glicina i 200 mL metanola. Volumen se podesi na 1 L dodatkom deionizirane vode.

3.1.3. Sojevi kvasca

Kvasci korišteni u eksperimentalnom radu prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u radu.

Soj	Genotip
MPY733 = BMA41 wild type	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>
MPY736 = BMA41 <i>rrp6Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4</i>
MPY737 = BMA41 <i>rrp47Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3 leu2 his3 trp1Δ rrp47::KanMX4</i>
BMA41 <i>mpp6Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 mpp6::KanMX4</i>
BMA41 <i>air1Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3 leu2 his3 trp1Δ air1::KanMX4</i>
BMA41 <i>air2Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3 leu2 his3 trp1Δ air2::KanMX4</i>
BMA41 <i>air1Δair2Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 air1::HIS3 air2::KanMX4</i>
BMA41 <i>trf4Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3 leu2 his3 trp1Δ trf4::KanMX4</i>
BMA41 <i>trf5Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3 leu2 his3 trp1Δ trf5::KanMX4</i>
BMA41 <i>rrp6 Y361A</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6Y361A</i>

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj stanica kvasaca

Tekuća hranjiva podloga korištena za uzgoj stanica kvasaca je YPDa. Sastav tekuće YPDa hranjive podloge: pepton 20 g/L, kvašćev ekstrakt 10 g/L, adenin 0,1 g/L. Hranjiva podloga izabranog volumena se sterilizira u autoklavu nakon čega se dodaje glukoza u koncentraciji od 2% (20 g/L). Sastav krute YPDa podloge: pepton 20 g/L, kvašćev ekstrakt 10 g/L, adenin 0,1 g/L, glukoza 20 g/L, agar 15 g/L. Higromicin B, u finalnoj koncentraciji od 300 µg/mL dodati u ohlađenu, autoklaviranjem steriliziranu podlogu. YNB(-his) tekuća podloga, korištena je isključivo za uzgoj soja BMA41 *air1Δair2Δ*.

Sastav hranjive podloge: YNB-AA 6,7 g/L, „drop out“ (Tablica 3.) 1,6 g/L, uracil 0,02 g/L, leucin 0,04 g/L, triptofan 0,02 g/L. Šećer dodati naknadno, neposredno prije naciepljivanja u konačnoj koncentraciji od 2 %. U krute YNB(-his) podloge glukozu u koncentraciji od 20 g/L potrebno je dodati odmah. U istu se dodaje agar 15 g/L.

Tablica 3. Sastav „drop out“ smjese.

Adenin (Ade)	3 g	Izoleucin (Ile)	2 g
Alanin (Ala)	2 g	Lizin (Lys)	4 g
Arginin (Arg)	2 g	Metionin (Met)	2 g
Asparagin (Asn)	2 g	α -aminobenzojeva kiselina	0,2 g
Asparaginska kiselina (Asp)	2 g	Fenilalanin (Phe)	2 g
Cistein (Cys)	2 g	Prolin (Pro)	2 g
Glutamin (Gln)	2 g	Serin (Ser)	2 g
Glutaminska kiselina (Glu)	2 g	Treonin (Thr)	2 g
Glicin (Gly)	2 g	Tirozin (Tyr)	2 g
Inozitol	2 g	Valin (Val)	2 g

3.1.5. Početnice

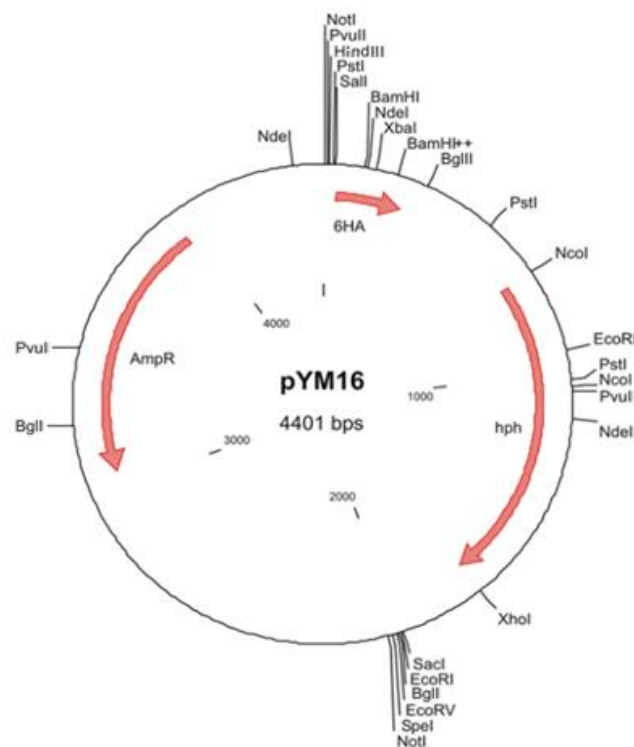
Početnice korištene u radu za metodu PCR navedene su u tablici 4.

Tablica 4. Korištene početnice za umnažanje sekvence koja kodira za protein Pir3 metodom PCR-a.

Početnica <i>PIR3</i> fwd	5' GTTCTCAGTGCCATGAAGTTTATTTGCAAGCTATAGATTTAATTG ACTGTCGTACGCTGCAGGTCGAC 3'
Početnica <i>PIR3</i> rev	5' AATTCGTGAAGTTAAAGGAGGACGACTCCGATTGATCGATGCAT CGTTCAATCGATGAATTCGAGCTCG 3'

3.1.6. Plazmid pYM16

Plazmid pYM16 je cirkularna molekula DNA veličine 4401 pb (slika 3.). Sadržava hemaglutininsku (HA) oznaku, regiju koja omogućuje rezistenciju na antibiotik ampicilin (AmpR) te regiju koja omogućuje rezistenciju na antibiotik higromicin B (hph). HA oznaka koristi se za obilježavanje proteina i njegovu detekciju anti-HA antitijelima imunoblot metodom. Regije koje omogućuju rezistenciju na antibiotike koriste se kao selekcijski markeri, te su iste označene na slici 3. crvenim strelicama. U ovom radu dodavanje HA oznake odrađeno je prema protokolu Janke i sur., 2004.



Slika 3. Restriksijska mapa plazmida pYM16 s označenim restrikcijskim mjestima na kojima pojedini restrikcijski enzimi cijepaju plazmid te označenom regijom za rezistenciju na antibiotik ampicilin – AmpR, regijom za rezistenciju na antibiotik higromicin B – hph i hemaglutininskom sekvencom – 6HA.

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) omogućava amplifikaciju točno određenog dijela DNA iz male količine genetičkog materijala u *in vitro* uvjetima. U ovom radu PCR metoda korištena je u namjenu umnažanja HA oznake i higromicinskog markera iz plazmida pYM16.

Tablica 5. Sastav PCR reakcijske smjese.

otopine	Volumen u PCR reakcijskoj smjesi
PCR pufer 10x koncentriran	5 μ L
10 mM dNTPs	1,75 μ L
10 mM reverse primer	3,2 μ L
10 mM forward primer	3,2 μ L
Plazmid pYM16	2 μ L
Taq polimeraza	1 μ L
dH ₂ O	33,85 μ L
ukupno	50 μ L

Korišteni uvjeti reakcije namješteni na Thermocycleru (Eppendorf, Mastercycler nexus X2) su: 4' 95 °C // 30x (30" 95 °C/ 30" 54 °C/ 2' 40" 72 °C) // 7' 72 °C, a sastav PCR reakcijske smjese naveden je u tablici 5.

PCR iz kolonije je metoda za brzo ispitivanje kolonija kvasaca koje su izrasle na selektivnom mediju nakon transformacije, kako bi se odredila prisutnost ili odsutnost umetnute DNA u novo konstruiranim sojevima kvasca. U radu je korištena za provjeru nazočnosti hemaglutininske oznake iza gena *PIR3*.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese pri provođenju PCR kolonija.

Otopine	Volumen u PCR reakcijskoj smjesi
10 mM forward primer	0,4 μ L
10 mM reverse primer	0,4 μ L
OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer	10 μ L
dH ₂ O	4,2 μ L
Stanice kvasca*	5 μ L
Ukupno	20 μ L

*Stanice kvasca iz jedne kolonije resuspendirane su u 50 μ L sterilne deionizirane vode od čega se uzimao volumen od 5 μ L.

Korišteni uvjeti reakcije namješteni na Thermocycleru (Eppendorf, Mastercycler nexus X2) su: 5' 94 °C // 30x (20" 94 °C/ 30" 58 °C/ 30" 68 °C) // 5' 68 °C, a sastav reakcijske smjese PCR kolonija naveden je u tablici 6, te početnice korištene za isto u tablici 7.

Tablica 7. Početnice korištene za provjeru nazočnosti hemaglutininske oznake iza gena PIR3.

Početnica <i>PIR3</i> fwd	5' GCACATTGGTTCTCAGTGCC 3'
Početnica <i>PIR3</i> rev	5' GCCTTAATTAACCCGGGGATCT 3'

3.2.2. Gel elektroforeza DNA

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu koristi se za razdvajanje i vizualizaciju fragmenata DNA te izolaciju željenog fragmenta DNA. U ovom radu korištena je agarozna gel elektroforeza u svrhu provjere umnažanja sekvence DNA koja kodira za hemaglutininsku oznaku s plazmida pYM16 te provjere ciljane ugradnje umnožene sekvence u pojedine mutante podjedinica egzosoma.

Pripremani su 1% (provjera umnažanja sekvence) i 2% (provjera ugradnje umnožene sekvence) agarozni gel na način da se agaroz zagrijavanjem otopi u 1x TAE puferu. Pripremljeni volumen izlije se u kalup za horizontalnu elektroforezu, a kada dođe do polimerizacije kalup s gelom uroni se u kadu s 0,5x TAE pufer, te se uzorci (6 µL) i standard (10 µL) nanose u jažice. Tijekom provođenja gel elektroforeze (Pharmacia Biotech, EPS 3500 Electrophoresis Power Supply; Bio – rad, sustav za pripremu gela i provođenje elektroforeze) podešen je napon od 140 V. Nakon razdvajanja DNA fragmenata, gel je inkubiran na sobnoj temperaturi u otopini etidij bromida 20 minuta. Etidij bromid interkalira u DNA molekule, apsorbira UV svjetlo dobiveno korištenjem Uvi – Doc uređaja (Uvitec Cambridge, Uvidoc HD6) te se dobije slika gela i na njemu razvijenih bendova.

3.2.3. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija plazmidne DNA mjerena je pomoću spektrofotometra Nanodrop One (Thermo Scientific, NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV – Vis Spectrophotometer). Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda.

3.2.4. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* LiAc metodom

U tekućoj YPDa podlozi (iznimka – soj BMA41 *air1Δair2Δ* koji se uzgaja u YNB(– his) tekućoj podlozi) uzgojene su stanice kvasca do logaritamske faze rasta. Centrifugiranjem pri 3000 rpm (Technica, Centric 322A – korištena svaki put za 3000 rpm) kroz 5 minuta izdvojeno

je 5 OD₆₀₀ stanica. Nakon dodatka 1 mL sterilne deionizirane vode, centrifugiranja pri 3000 rpm 5 minuta, dodatka 1 mL 0,1 M litij acetata na talog i ponovnog centrifugiranja pri 8000 rpm (Sigma, Fisher Biobloc Scientific 1 – 15, korištena svaki put za 8000 rpm) 30 sekundi, na talog se redom dodaju: 240 µL 50 % PEG, 36 µL 1 M litij acetat, 25 µL jednolančane DNA (služi kao nosač DNA odnosno olakšava unos plazmida u stanicu kvasca), 50 µL plazmida. Transformacijska smjesa se vorteksira dok se ne postigne homogenost, inkubira u termobloku 30 minuta na 30 °C, a zatim se podvrgava toplinskom šoku inkubacijom u termobloku 20 minuta na 42 °C. Centrifugiranjem pri 8000 rpm 15 sekundi odvoji se supernatant, a na talog se dodaje 3 mL YPDa podloge te se inkubira na tresilici (180 rpm) pri 30 °C 2 do 5 sati kako bi se omogućila ekspresija selektivnog biljega. Nadalje se provodi centrifugiranje pri 3000 rpm 5 minuta, resuspendiranje taloga u 1 mL sterilne deionizirane vode i u konačnici naciepljivanje na odgovarajuću selektivnu podlogu – YPDa + hyg za sve sojeve kvasca osim za soj BMA41 *air1Δair2Δ* za koji se koristi podloga YNB(- his) + hyg.

3.2.5. Izolacija proteina

Iz kulture stanica kvasca izdvojeno je 2,5 OD₆₀₀ stanica. Izuzete stanice se centrifugiraju pri 8000 rpm 1 minutu, a nakon odvajanja supernatanta na talog se doda 1 mL sterilne deionizirane vode kako bi se stanice isprale. Centrifugiranje pri 8000 rpm 1 minutu ponovi se kao i uklanjanje supernatanta, a na talog se doda 100 µL sterilne deionizirane vode, resuspendira, doda 100 µL NaOH te resuspendira. Smjesa se 5 minuta inkubira na sobnoj temperaturi, centrifugira pri 8000 rpm 1 minutu te se ukloni supernatant. Na talog se doda 50 µL pufera i inkubira 3 minute u termobloku pri 100 °C. Nakon posljednjeg centrifugiranja pri 8000 rpm 1 minutu potrebno je prebaciti epice u hladni blok kako ne bi došlo do degradacije proteina. Supernatant u kojem se nalaze željeni proteini prebaci se u novu sterilnu epicu i čuva na – 20 °C. Navedeni protokol izolacije svih proteina rađen je prema radu Kushnirov, 2010.

3.2.6. Gel elektroforeza proteina

SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis) je metoda kojom se proteini razdvajaju u električnom polju na temelju njihove razlike u molekularnoj masi.

Poliakrilamidni gel sastoji se od dva sloja. Gornji sloj služi kao gel za sabijanje u kojem se molekule proteina skupe u jednu frontu kako bi u donjem gelu, koji služi kao gel za razdvajanje, bile odvojene isključivo po razlici u veličini. Pripremani su 4,5 % gel za sabijanje i 10 % gel za razdvajanje. Nakon polimerizacije gel se prenese u kadu, uroni se u pufer za elektroforezu, a u jažice se nanose standard (3 µL) i uzorci (7 µL) te se na uređaju za elektroforezu (Pharmacia

Biotech, EPS 300 Electrophoresis Power Supply; Bio – rad, sustav za pripremu gela i provođenje elektroforeze) zada napon od 180 V te struja jakosti 380 mA. Postupak se provodi 40 minuta.

3.2.7. Western blot

Western blot je laboratorijska metoda koja omogućuje specifičnu identifikaciju pojedinog proteina iz smjese proteina u tri koraka: 1. Razdvajanje proteina po veličini; 2. Prijenos proteina na membranu te blokiranje membrane; 3. Vezanje specifičnih primarnih i sekundarnih antitijela na protein te vizualizacija. Metoda je korištena kako bismo potvrdili prisutnost ili odsutnost Pir3 proteina tijekom različitih faza rasta stanica.

Nakon provedene poliakrilamidne elektroforeze proteini se metodom mokrog prijenosa prebacuju s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu, a metoda se provodi u Towbin puferu. Napon koji je zadan na uređaju za transfer (Pharmacia Biotech, EPS 300 Electrophoresis Power Supply; Bio – rad, sustav za izvedbu metode mokrog prijenosa) je 90 V, jakost struje 400 mA te trajanje 90 minuta. Nakon završenog prijenosa proteina, nitrocelulozna membrana se boja Ponceau S bojom kojom se ispituje efikasnost elektroforeze te bojanje LMW standarda. Deioniziranom vodom ispiru se višak boje s membrane, a grafitnom olovkom označuje se položaj standarda. Nitrocelulozna membrana inkubira se u puferu za blokiranje (0.1 g obranog mlijeka u prahu u 10 mL TBST pufera) u trajanju od 60 minuta uz lagano treskanje (200 rpm) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela za membranu. Membrana se odreže na 2 dijela od kojih je jedan dio (gornji) u kojem se očekuje pojava proteina Pir3, a drugi dio (donji) u kojem se očekuje pojava „housekeeping“ proteina (Pgk1). Dio membrane na kojoj su Pgk1 proteini se uroni u 5 mL primarnih anti-Pgk1 mišjih antitijela (1 μ L Anti – PGK1 antibody [22C5D8] (ab113687) / 50 mL TBST pufera) te ostavlja na 4 °C preko noći. Dio membrane na kojoj su Pir3 proteini se uroni u 5 mL anti-HA tag antitijela (3 μ L high affinity anti – HA/5 mL TBST pufera) uz trešnju (200 rpm) na 60 minuta. Membrana se ispiru u 5 mL TBST pufera uz protresanje (200 rpm), 3 puta po 10 minuta. Korištenjem WesternSure Pen–a (LI – COR) označi se položaj standarda kako bi se s mjesta standarda emitirala svjetlost prilikom analize membrane kemiluminiscencijom, a zatim se membrana inkubira 4 minute u Biorad Clarity Western otopini. Korištenjem C–digit skenera (Licor, C–DiGit Blot Scanner) vizualiziraju se proteinske vrpce na koje su vezana antitijela. Sljedeći dan se na dio membrane s „housekeeping“ proteinima dodaje otopina anti-mouse sekundarnih antitijela koja se zadržava 60 minuta uz trešnju (200 rpm). Postupak ispiranja membrane, označavanja standarda, inkubacije u Biorad Clarity Western otopini i vizualizacije proteinskih vrpce ponavlja se istim

protokolom kao što je opisano za dio membrane na kojoj se očekuje pojava/odsutnost Pir3 proteina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam koji se koristi za istraživanje i razumijevanje temeljnih staničnih procesa jer su mehanizmi smatanja proteina i put sekrecije gotovo istovjetni kao i kod viših eukariota (Botstein i Fink, 2011).

Stanična stijenka kvasca, organela koju ne nalazimo kod životinjskih stanica, određuje oblik stanice kvasca te pruža fizičku i osmotsku zaštitu. Podložna je stalnom remodeliranju, uvjetovanom promjenama u okolnom mediju te fazi rasta stanice (Klis i sur., 2002). Sastav polisaharidne mreže koja na sebe veže proteine stanične stijenke modificira se kao odgovor stanice na promjene u ekosustavu (Klis i sur., 2002).

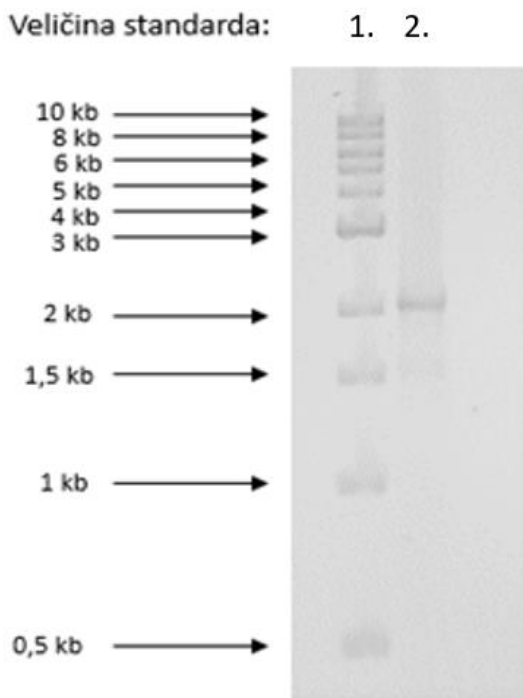
Stabilnost stanične stijenke važna je za vijabilnost stanice (Klis i sur., 2002) pri čemu važnu ulogu ima aktivnost multiproteinskog 3' – 5' ribonukleaznog kompleksa RNA egzosoma (Allmang i sur., 1999). Kako bi ispitali djelovanje kofaktora RNA egzosoma na ekspresiju odabranih proteina stanične stijenke nužno je omogućiti vizualizaciju istih. Stoga je, cilj ovog rada bio obilježiti protein Pir3 hemaglutininskom oznakom (HA oznakom) u mutantima kofaktora RNA egzosoma. Time je omogućeno praćenje proteina Pir3 u različitim mutantima kofaktora RNA egzosoma ovisno o fazi rasta stanica (logaritamska ili stacionarna faza rasta).

Plazmid pYM16 koji kodira za HA oznaku te higromicinski biljeg prethodno je umnožen i izoliran iz bakterije *Escherichia coli*. Lančanom reakcijom polimeraze umnožen je slijed nukleotida koji kodira za HA oznaku i regiju odgovornu za rezistenciju na higromicin. Dobiveni PCR produkt korišten je za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pomoću litij acetata, pri čemu je, HA oznaka dodana iza proteina Pir3. Uspješnost ugradnje iste, provjerena je metodom PCR iz kolonija kvasca te izolacijom ukupnih proteina tijekom logaritamske i stacionarne faze rasta stanica u svrhu detekcije proteina Pir3 metodom Western blot.

4.1. Označavanje gena *PIR3* hemaglutininskom sekvencom u različitim mutantima RNA egzosoma

Umnažanje sekvence plazmida pYM16 koja sadrži HA oznaku i higromicinski marker izvršeno je lančanom reakcijom polimerazom s dva seta početnica koje odgovaraju genu iza kojeg se dodaje HA oznaka – *PIR3* (Janke i sur., 2004). Uspješnost lančane reakcije polimerazom

provjerena je DNA elektroforezom. Upotrebom 1 % agaroznog gela uočavaju se vrpce veličine od oko 2 kb što odgovara veličini očekivanog PCR–produkta (slika 4.).

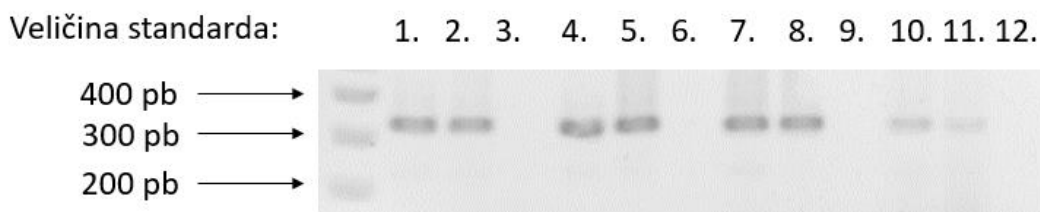


Slika 4. Provjera uspješnosti produkata PCR reakcije 1. standardi (NEB 1kb DNA ladder); 2. PCR produkt *PIR3*–HA.

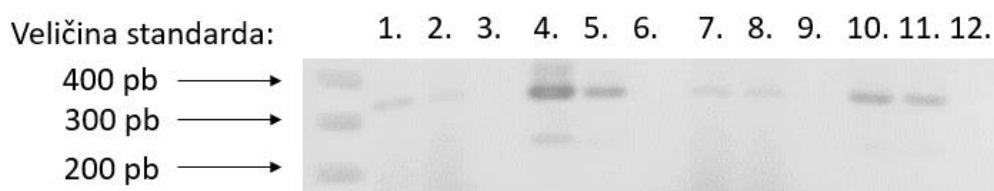
Transformacija je provedena u liniji soja BMA41 kod divljeg tipa te *rrp6Δ*, *rrp47Δ*, *mpp6Δ*, *air1Δ*, *air2Δ*, *air1Δair2Δ*, *trf4Δ*, *trf5Δ* i *Y361A*. U sve navedene sojeve dodana je HA oznaka iza proteina Pir3. Transformirani kvasac nacijepljen je na hranjivu podlogu s higromicinom. Na svakoj ploči koja sadrži higromicin poraslo je između 2 i 20 kolonija što je dokaz uspješne transformacije.

4.2. PCR analiza gena *PIR3* u konstruiranim sojevima

Metoda PCRa iz kolonije korištena je za provjeru ugradnje HA oznake iza gena *PIR3*. Produkti PCRa iz kolonije provjereni su DNA elektroforezom, odnosno uporabom 2 % agaroznog gela na kojem se uočavaju vrpce veličine oko 332 parova baza što odgovara očekivanoj veličini PCR–produkta. Provjerene su 2 biološke replike za svaki transformirani soj, a uz njih, u svrhu negativne kontrole i ishodišna kolonija korištena za transformaciju to jest kolonija koja ne kodira za HA oznaku (Slika 5., Slika 6., Slika 7.). Na ovaj način potvrđena je uspješnost transformacije odnosno ugradnje HA oznake iza gena *PIR3*.



Slika 5. Provjera uspješnosti ugradnje sekvence koja kodira za hemaglutininsku oznaku metodom PCR kolonija ponavljajućim redom u 2 biološke replike te negativna kontrola*: 1., 2., 3. BMA41 wt; 4., 5., 6. BMA41 *rrp6Δ*; 7., 8., 9. BMA41 *rrp47Δ*; 10., 11., 12. BMA41 *air1Δ*.



Slika 6. Provjera uspješnosti ugradnje sekvence koja kodira za hemaglutininsku oznaku metodom PCR kolonija ponavljajućim redom u 2 biološke replike te negativna kontrola*: 1., 2., 3. BMA41 *Y361A*; 4., 5., 6. BMA41 *air2Δ*; 7., 8., 9. BMA41 *air1Δair2Δ*; 10., 11., 12. BMA41 *mpp6Δ*.



Slika 7. Provjera uspješnosti ugradnje sekvence koja kodira za hemaglutininsku oznaku metodom PCR kolonija ponavljajućim redom u 2 biološke replike te negativna kontrola*: 1., 2., 3. BMA41 *trf4Δ*; 4., 5., 6. BMA41 *trf5Δ*.

* negativna kontrola je ishodišna kolonija korištena za transformaciju u kojoj iza Pir3 proteina nije ugrađena hemaglutininska oznaka

4.3. Western blot analiza proteina Pir3 u proteinskim ekstraktima konstruiranih sojeva

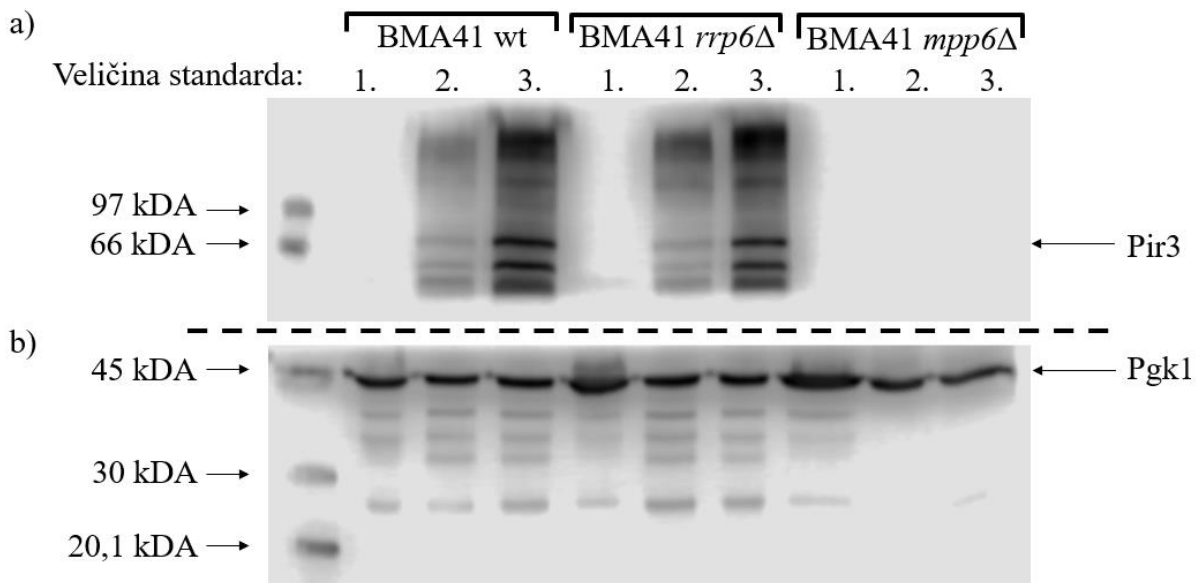
Modifikacija stanične stijenke ovisi o fazi staničnog ciklusa, dostupnosti hranjivih tvari i uvjetima okoline kao što su pH, temperatura i dostupnost kisika. Stanična stijenka kvasca je različita u logaritamskoj i stacionarnoj fazi rasta stanica, a njena debljina se povećava ulaskom u kasnu stacionarnu fazu, bez promjene elastičnih svojstava stanične stijenke (Shimoi i sur., 1998). Spomenute modifikacije usko su povezane s promjenama u proteinskom sastavu koji se

također mijenja kroz različite faze rasta stanice. Stanica nastoji sačuvati energiju i pritom proizvoditi samo one proteine koji su joj u određenoj fazi potrebni.

U eukariotskim stanicama, 3' – 5' degradacija i procesiranje RNA je postignuto aktivnošću RNA egzosoma (Chlebowski i sur., 2013). Egzosom ima veliku ulogu u RNA metabolizmu u jezgri i citoplazmi jer cilja gotovo sve vrste RNA molekula. Njegove uloge uključuju nadzor i transport mRNA molekula, obradu i sazrijevanje rRNA, snRNA i snoRNA te degradaciju nekodirajućih transkripata (Wyers i sur., 2005). U ljudskim stanicama, narušena regulacija aktivnosti RNA egzosoma uvelike utječe na ekspresiju gena (Davidson i sur., 2019), na način da ispoljava različite ljudske maligne bolesti i poremećaje (Fasken i sur., 2020). Rijetke bolesti uzrokovane mutacijama u genima koji kodiraju za ljudske egzosomske podjedinice nazivaju se egzosomopatijama (Morton i sur., 2017).

Za ispitivanje prisutnosti proteina Pir3 tijekom pojedinih faza rasta stanica (logaritamska i stacionarna faza) izolirani su ukupni proteini stijenke kvasaca te su metodom SDS–PAGE razdvojeni po veličini, i analizirani imunoblot metodom koja podrazumijeva specifično vezanje HA antitijela. Kao kontrolni protein korišten je Pgk1 koji kao konstitutivni protein stanice kvasca ostaje nepromjenjiv neovisno o fazi rasta stanice.

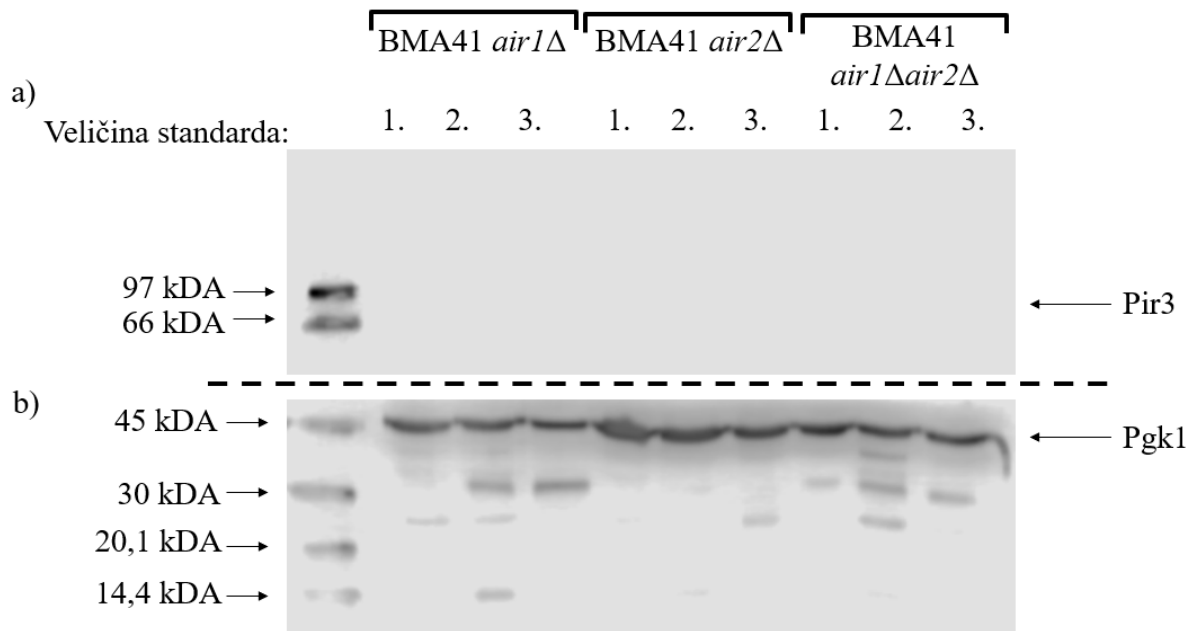
Kod sojeva BMA41 wt i BMA41 *rrp6Δ* protein Pir3 nije detektiran tijekom logaritamske faze rasta dok je detektiran u stacionarnoj fazi rasta nakon 3 dana, iako slabije nego u stacionarnoj fazi rasta nakon 10 dana. Kod soja BMA41 *mpp6Δ* protein Pir3 nije detektiran niti u jednoj fazi rasta stanica (Slika 8.).



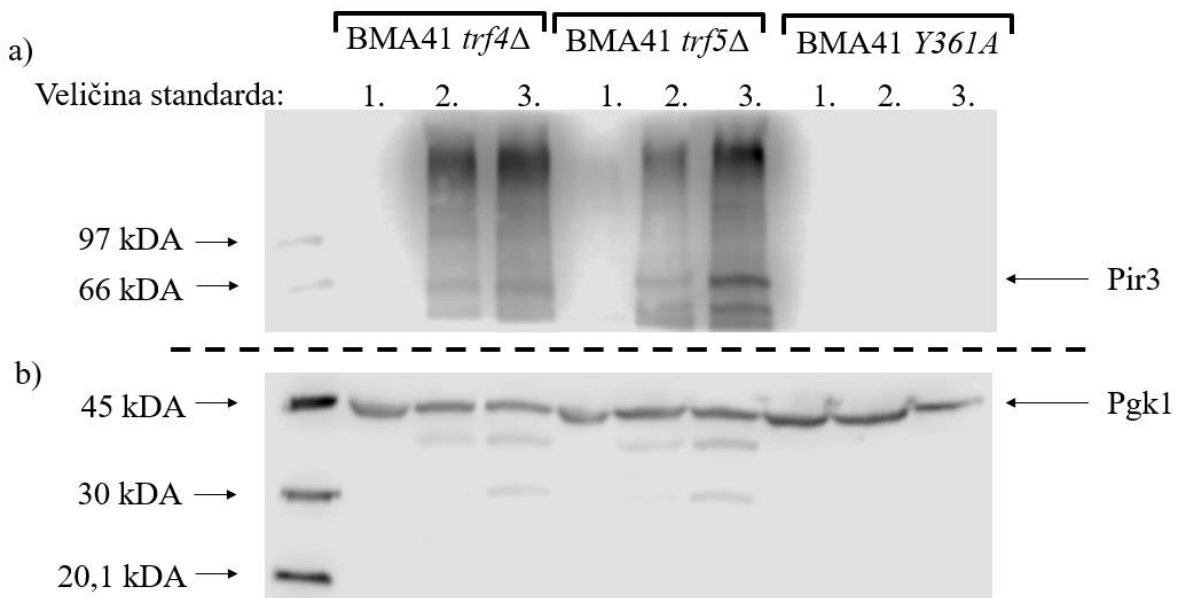
Slika 8. a) Provjera prisutnosti proteina Pir3 u pojedinim fazama staničnog ciklusa, ponavljajućim redom su prikazane logaritamska faza (1.), 3.dan stacionarne faze (2.) i 10. dan stacionarne faze rasta stanica (3.); **b)** Provjera prisutnosti proteina Pgk1 za svaki naneseni uzorak.

Kod sojeva BMA41 *air1Δ*, BMA41 *air2Δ* i BMA41 *air1Δair2Δ* nije detektiran protein Pir3 niti u logaritamskoj niti u stacionarnoj fazi rasta stanica (Slika 9.). Uočava se da u soju BMA41 *trf4Δ* nije detektiran protein Pir3 tijekom logaritamske faze rasta, ali ga detektiramo u stacionarnoj fazi rasta i nakon 3 i nakon 10 dana rasta. Kod soja BMA41 *trf5Δ* uočava se protein Pir3 u 3. i 10. danu stacionarne faze rasta, dok ga tijekom logaritamske faze ne detektiramo. Kod soja BMA41 *Y361A* nije detektiran protein Pir3 tijekom provjeravanih faza rasta stanica (Slika 10.). Kod soja BMA41 *rrp47Δ* protein Pir3 detektiran je tijekom logaritamske faze rasta, ali nije tijekom stacionarne faze rasta stanica (Slika 11.).

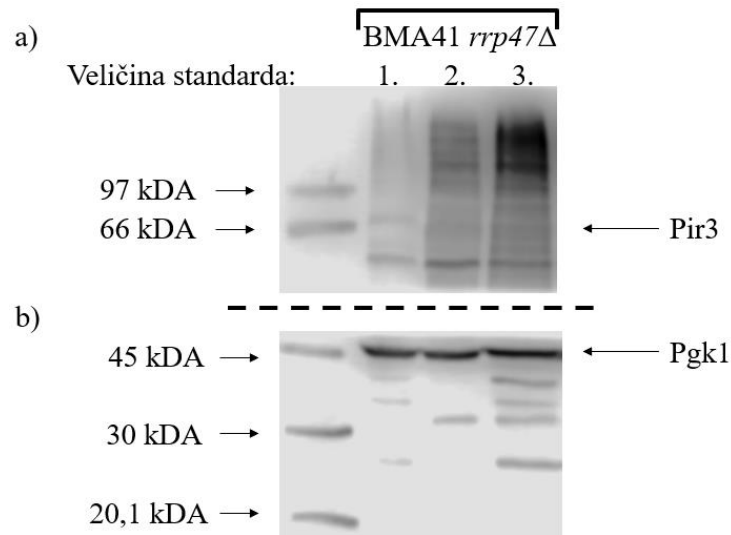
Nedavno je pokazano kako je RNA egzozom jedan od važnih regulatora stanične stijenke kvasca (Novačić i sur., 2021), a njegova disregulacija dovodi do problema u regulaciji remodelacije stanične stijenke prilikom čega je pogođen i proteinski sastav stijenke (Zhang i sur., 2010). Zaključno, eliminacijom određenog kofaktora RNA egzozoma, vidljivo je kako se mijenja i prisutnost proteina Pir3.



Slika 9. a) Provjera prisutnosti proteina Pir3 u pojedinim fazama staničnog ciklusa, ponavljajućim redom su prikazane logaritamska faza (1.), 3. dan stacionarne faze (2.) i 10. dan stacionarne faze rasta stanica (3.); **b)** Provjera prisutnosti proteina Pgk1 za svaki nanesen uzorak.



Slika 10. a) Provjera prisutnosti proteina Pir3 u pojedinim fazama staničnog ciklusa, ponavljajućim redom su prikazane logaritamska faza (1.), 3. dan stacionarne faze (2.) i 10. dan stacionarne faze rasta stanica (3.); **b)** Provjera prisutnosti proteina Pgk1 za svaki nanesen uzorak.



Slika 11. a) Provjera prisutnosti proteina Pir3 u pojedinim fazama staničnog ciklusa, redom su prikazane logaritamska faza (1.), 3. dan stacionarne faze (2.) i 10. dan stacionarne faze rasta stanica (3.); **b)** Provjera prisutnosti proteina Pgk1 za svaki nanesen uzorak

Promjene u staničnoj stijenci događaju se ovisno o fazi staničnog ciklusa i uvjetima okoline. Kako stanice ulaze u ranu stacionarnu fazu tako debljina stanične stijenske raste, a debljina se povećava i ulaskom u kasnu stacionarnu fazu, bez promjene elastičnih svojstava stanične stijenske (Shimoi i sur., 1998). Promjene u staničnoj stijenci usko su povezane s promjenama u proteinskom sastavu koji se također mijenja kroz različite faze rasta stanice što je pokazano i u ovom završnom radu. Stanica nastoji sačuvati energiju i pritom proizvoditi samo one proteine koji su joj u određenoj fazi potrebni. Disregulacijom RNA egzozoma dolazi do nepovoljnih situacija unutar stanice kao što su problemi u regulaciji remodelacije stanične stijenske prilikom čega je pogođen i proteinski sastav stijenske (Zhang i sur., 2010). Eliminacijom određenog kofaktora RNA egzozoma vidljivo je kako se mijenja i prisutnost proteina Pir3. Ovi rezultati pokazuju kako kofaktori egzozoma mogu imati ulogu u ekspresiji pojedinih proteina stanične stijenske kvasca, te tako utječu i na stabilnost same stanične stijenske.

5. ZAKLJUČAK

1. PCR analiza gena *PIR3* pokazala je kako je hemaglutininska sekvenca uspješno dodana u sve mutante RNA egzosoma.
2. Western blot analiza proteina Pir3 u proteinskim ekstraktima pokazala je kako je ovaj protein prisutan kao i u wt tipu stanica u *rrp6Δ*, *trf4Δ*, *trf5Δ* i *rrp47Δ* mutantima za kofaktore egzosoma, a nije prisutan u *mpp6Δ*, *air1Δ*, *air2Δ*, *air1Δair2Δ* i *Y361A* mutantima za kofaktore egzosoma.
3. Kofaktori egzosoma utječu na ekspresiju proteina stanične stijenke, Pir3.

6. POPIS LITERATURE

Allmang C., Petfalski E., Podtelejnikov A., Mann M., Tollervey D., Mitchell P. (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes and Development* **13**: 2148–2158

Anwar M. I., Muhammad F., Awais M. M. (2017) A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal* **73**: 1–11

Cappellaro C., Mrsa V., Tanner W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *Journal of Bacteriology* **180**: 5030–5037

Casci T. (2009) A portrait of yeast. *Nature Reviews Genetics* **10**: 223 – 223

Castillo L., Martinez A. I., Garcerá A., Elorza M. V., Valentín E., Sentandreu, R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast* **20**: 973–983

Chlebowski A., Lubas M., Jensen T. H., Dziembowski A. (2013) RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**: 552–560

Davidson L., Francis L., Cordiner R. A., Eaton J. D., Estell C., Macias S., Cáceres J. F., West S. (2019) Rapid depletion of DIS3, EXOSC10, or XRN2 reveals the immediate impact of exoribonucleolysis on nuclear RNA metabolism and transcriptional control. *Cell Rep* **26**: 2779–2791

Dziembowski A., Lorentzen E., Conti E., Séraphin B. (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**: 15–22

Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrsa V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 11523–11529

Enyenihi A.H., Saunders W.S. (2003) Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 47–54

- Fasken M. B., Morton D.J., Kuiper E. G., Jones S. K., Leung S. W., Corbett A. H. (2020) The RNA exosome and human disease. *Methods in Molecular Biology* **2062**: 3–33
- Galao R. P., Scheller N., Alves-Rodrigues I., Breinig T., Meyerhans A., Díez J. (2007) *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microb Cell Fact* **6**: 32
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* **274**: 546–567.
- Harold F. M., (2002) Force and compliance: rethinking morphogenesis in walled cells. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 271–282
- Herskowitz I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **52**: 536–553
- Houseley J. (2012) Form and function of eukaryotic unstable non-coding RNAs. *Biochemical Society Transactions* **40**: 836–841
- Janke C., Magiera M. M., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H., Moreno-Borchart A., Doenges G., Schwob E., Schiebel E., Knop M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–962
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* **6**
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 239–256
- Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185–202
- Kollár R., Petráková E., Ashwell G., Robbins P. W., Cabib E. (1995) Architecture of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 1170–1178
- Kushnirov V. V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**: 857–860
- Lebreton A., Tomecki R., Dziembowski A., Séraphin B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**: 993–996
- Liu Q., Greimann J. C., Lima C.D. (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**: 1223–1237

- Liu W., Li L., Ye H., Chen H., Shen W., Zhong Y., He H. (2017) From *Saccharomyces cerevisiae* to human: The important gene co-expression modules. *Biomedical Reports* **7**: 153–158
- Makino D.L., Schuch B., Stegmann E., Baumgärtner M., Basquin C., Conti E. (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**: 54–58
- Matuo R., Sousa F. G., Soares D. G., Bonatto D., Saffi J., Escargueil A. E., Larsen A. K., Henriques J. A. P. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* **70**: 491–502
- Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M., Tollervey D. (1997) The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457–466
- Morton D. J., Kuiper E.G., Jones S.K., Leung S. W., Corbett A. H., Fasken M. B. (2017) The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *RNA* **24**: 127–142
- Moukadiri I., Jaafar L., Zueco J. (1999) Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 double mutant by reducing agents. *Journal of Bacteriology* **181**: 4741–4745
- Moukadiri I., Zueco J. (2001) Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Research* **1**: 241–245
- Mrša V., Seidl T., Gentzsch M., Tanner W. (1997) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1145–1154
- Mrša V., Tanner W. (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (Members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**: 813–820
- Osumi M. (1998) The Ultrastructure Structure of Yeast: Cell Wall structure and Formation. *Micron* **29**: 207–233
- Shimoi H., Kitagaki H., Ohmori H., Iimura Y., Ito K. (1998) Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *Journal of Bacteriology* **180**: 3381–3387

- Schneider C., Tollervey D. (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. Review **38**: 485–493
- Shaw J. A. (1991) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. The Journal of Cell Biology **114**: 111–123
- Lykke-Andersen S., Tomecki R., Jensen T.H., Dziembowski A. (2011) The eukaryotic RNA exosome: Same scaffold but variable catalytic subunits. RNA Biology **8**: 61–66
- Sherman F. (2002) Getting started with yeast. Methods in Enzymology **350**: 3–41
- Stuparević I., Mosrin-Huaman C., Hervouet-Coste N., Remenaric M., Rahmouni A. R. (2013) Cotranscriptional recruitment of RNA exosome cofactors Rrp47p and Mpp6p and two distinct Trf-Air-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complexes assists the exonuclease Rrp6p in the targeting and degradation of an aberrant messenger ribonucleoprotein particle (mRNP) in yeast. Journal of Biological Chemistry **288**: 31816–31829
- Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Food Technology and Biotechnology **48**: 317–328
- Thoms M., Thomson E., Baßler J., Gnädig M., Griesel S., Hurt E. (2015) The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. Cell **162**: 1029–1038
- Wasmuth E. V., Januszyk K., Lima C.D. (2014) Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. Nature **511**: 435–439
- Wyers F., Rougemaille M., Badis G., Rousselle J.C., Dufour M. E., Boulay J., Régnault B., Devaux F., Namane A., Séraphin B. (2005) Cryptic Pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. Cell **121**: 725–737
- Yin Q. Y., de Groot P. W. J., de Jong L., Klis F. M., De Koster C. G. (2007) Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research **7**: 887–896
- Zlotnik H., Pilar-Fernandez M., Bowers B., Cabib E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. Journal of Bacteriology **159**: 1018–1026

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Korina Penšić

Ime i prezime studenta